

B4

IN THE UNITED STATES AND TRADEMARK OFFICE

Application No.:

U.S. National Serial No.:

Filed :

German Patent Application No.: DE 102 35 620.3

VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

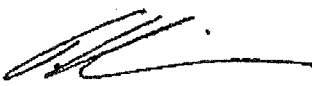
My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the German language in which the above identified German Patent Application was filed, and that, to the best of my knowledge and belief, the English translation of the German Patent Application No. DE 102 35 620.3 is a true and complete translation of the above identified German Patent Application as filed.

I hereby declare that all the statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the patent application issued thereon.

Date: July 31, 2006

Full name of the translator:

  
Dr. rer. nat. Tobias EHNIS

Post Office Address:

Dr. Gassner & Partner  
Nägelsbachstr. 49 A  
91052 Erlangen  
Germany

**Use of a double-stranded ribonucleic acid to selectively inhibit expression of a given target gene**

The invention concerns the use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene. Furthermore, it concerns the use of such a ribonucleic acid to produce a medicament, a medicament and a method, to selectively inhibit expression of the aforementioned target gene in a cell.

A method to inhibit expression of a target gene in a cell is known from DE 101 00 586 C1, in which an oligoribonucleotide having a double-stranded structure is introduced into the cell. One strand of the double-stranded structure is complementary to the target gene.

It is known from Elbashir, S.M. et al., Nature 411 (2001), pages 494-498, that a short dsRNA in which three nucleotides are not complementary to the target gene hardly inhibits expression of a target gene. On the other hand, a completely complementary dsRNA induces effective inhibition of expression of the target gene.

From Holen, T. et al., Nucleic Acids Research 30 (2002), pages 1757-1766, it is known that inhibition of expression of a gene by short dsRNA by means of RNA interference is also possible with dsRNAs, one of whose strands exhibits one or two nucleotides that are not complementary to the target gene.

Many diseases and defects of cells result from an alteration of a gene, often a proto-oncogene, that is important to cells by one or few point mutations. The problem in treating such a

disease or such cells with the methods known to date is that inhibition of expression of the mutated gene often leads also to an inhibition of the unmutated gene. This is often associated with grave side effects.

The task of the present invention is to remove these shortcomings in accordance with the state-of-the-art. In particular, a use of a dsRNA to selectively inhibit expression of a target gene in a cell having a point mutation not found in an original gene is to be made available, in which expression of the original gene remains largely unaffected. Furthermore, a medicament and a method to selectively inhibit expression of a given target gene, as well as a use for the production of the medicament are to be made available. This task is solved by the features of Claims 1, 2, 17, and 31. Advantageous embodiments result from the features of Claims 3 to 16, 18 to 30, and 32 to 41.

According to the invention, a use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell having a point mutation not found in an original gene is intended, whereby an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target gene in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene. The invention further concerns the use of such dsRNA to produce a medicament to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell having a point mutation not found in an original gene. In this invention, a nucleotide is "complementary" to the target gene or original gene when it can form a specific Watson-Crick base pair with a nucleotide that corresponds to it in its own sequence position

therein. The target gene is generally understood to be the DNA strand of the double-stranded DNA present in the cell that is complementary to a DNA-strand that serves as a matrix for transcription, including all transcribed regions. As a rule this is the sense strand. The S1 strand can thus be complementary to an RNA transcript formed during expression or its processing product, e.g., an mRNA. It can, for example be sufficient for the S1 strand to be complementary to a part of the 3'-untranslated region of the mRNA. However, the target gene can also be a part of a viral genome. The viral genome can also be the genome of a (+) strand RNA virus, in particular a hepatitis C virus.

The original gene can be any gene that deviates by only one or a few point mutations from the target gene that is to be inhibited. In general it is a wild-type gene. DsRNA is present when the ribonucleic acid that consists of one or two nucleic acid strands exhibits a double-stranded structure. Not all nucleotides of the dsRNA must exhibit canonical Watson-Crick base pairs within the dsRNA. The maximum possible number of base pairs is the number of nucleotides in the shortest strand contained in the dsRNA. The region that is complementary to the target gene can exhibit—in order of ascending preference—fewer than 25, 19 to 24, 21 to 23, and particularly 21 nucleotides. The S1 strand can exhibit—in order of ascending preference—fewer than 30, fewer than 25, and particularly 21 to 24 nucleotides. It has been shown that short dsRNAs are particularly effective in inhibiting expression of a target gene. Such dsRNAs are also called siRNAs (short interfering RNAs).

In selective inhibition, expression of the original gene is inhibited less than that of the target gene. Ideally,

expression of the original gene should remain largely unaffected. To this end, dsRNA that is not optimal to inhibit expression of the target gene is selectively used. Thus, a dsRNA can be prepared that has so little complementarity to the original gene that its expression remains largely unaffected. Adverse side effects resulting from inhibition of the original gene can be avoided or lessened.

Inhibition of expression by means of dsRNA preferably occurs according to the principle of RNA interference. The nucleotide that is not complementary to the target gene is preferably not located at the 3'-end or 5'-end of the region. Ideally, the non-complementary nucleotide is located in the middle portion of the region. The target gene may exhibit one or two point mutations not found in the original gene. In that case, use according to the invention to selectively inhibit expression of the target gene is particularly suitable to selectively inhibit only this expression, and not that of the original gene.

In one embodiment of the invention, the original gene is a proto-oncogene and the target gene is an oncogene derived from it. An oncogene is frequently differentiated only by a single point mutation from the cellular proto-oncogene that corresponds to it. For this reason, however, inhibition of the expression of the oncogene using conventional dsRNA usually inhibits expression of the corresponding proto-oncogene as well. This is often associated with such grave side effects that a use of conventional dsRNA to inhibit the target gene in an organism is virtually impossible.

The cell can be tumor cell. In one embodiment of the invention, one nucleotide of the region is not complementary

to the target gene, and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene. Even such a small difference in the number of complementary nucleotides can be sufficient to almost completely inhibit expression of the target gene, while leaving expression of the original gene largely unaffected.

In one embodiment of the method, at least one base pair within the dsRNA is not complementary, i.e., the nucleotides of the base pair are not specifically paired according to Watson-Crick. By varying the number of non-complementary base pairs within the dsRNA, the effectiveness of the dsRNA can be modulated. Reduced complementarity within the dsRNA lessens its stability in the cell.

DsRNA preferably exhibits a single-stranded overhang consisting of 1 to 4, particularly 2 or 3 nucleotides at least at one end of the dsRNA. One end is a dsRNA region in which a 5'- and a 3'-strand end are present. DsRNA consisting only of the S1 strand accordingly exhibits a loop structure and only one end. DsRNA consisting of the S1 strand and an S2 strand exhibits two ends. Here, one end is formed in each case by a strand end on the S1 strand and one on the S2 strand. Single stranded overhangs reduce the stability of dsRNA in blood, serum, and cells, while simultaneously increasing the expression-inhibiting action of dsRNA. It is particularly advantageous for dsRNA to exhibit the overhang exclusively at one end, particularly at its end exhibiting the 3'-end of the S1 strand. The other end is then blunt in dsRNA that exhibits two ends, i.e., it lacks overhangs. Surprisingly, it has been shown that to increase the expression-inhibiting action of dsRNA, one overhang at one end of the dsRNA is sufficient and does not decrease stability to such an extent as occurs with

two overhangs. DsRNA with only one overhang has shown itself to be sufficiently stable and particularly effective in various cell culture mediums, as well as in blood, serum, and cells. Inhibition of expression is particularly effective when the overhang is located at the 3'-end of the S1 strand.

The S1 strand or an S2 strand possibly contained in the dsRNA can be complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene. The dsRNA may be present in a preparation suitable for inhalation, oral ingestion, infusion and injection, in particular for intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection. The preparation can consist of the dsRNA and a physiologically tolerated buffer, particularly a phosphate buffered saline solution.

Surprisingly, it has been shown that dsRNA that has simply been dissolved and administered in such a buffer is taken up by the cell and inhibits expression of the target gene, without the dsRNA having had to be packaged in a special vehicle.

Preferably, dsRNA is present in a physiologically tolerated buffer, in particular a phosphate buffered saline solution, or surrounded by a micellar structure, preferably a liposome, a virus capsid, or a capsoid. The dsRNA can be administered orally, by means of inhalation, infusion, or injection, in particular by intravenous, intraperitoneal, or intratumoral infusion or injection. Preferably, the dsRNA is administered to a mammal, preferably a human being, at a maximum dosage of 5 mg, particularly 2.5 mg, preferably 200  $\mu$ g, most preferably 100  $\mu$ g per kilogram body weight per day.

Furthermore, the invention concerns a medicament to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene, whereby the medicament contains a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) whereby an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene.

Furthermore, according to the invention a method to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene is intended, whereby a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the cell, and an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene.

With regard to other advantageous embodiments of the medicament and method that are the subject of this invention, see the above remarks.

In the following examples, the invention will be discussed on the basis of the figures. They show:

Figure 1 a graphic depiction of the inhibition of the expression of an HCV luciferase fusion protein by dsRNAs, which to a varying degree are complementary to a sequence of a target gene and



Figure 2 a graphic depiction of the inhibition of the expression of an HCV luciferase fusion protein by dsRNAs, which to a varying degree are complementary to a sequence of a target gene, and are partially formed from RNA strands that are not completely complementary to each other.

In order to make a reporter system, a 26-nucleotide-long sequence of a cDNA sequence that serves as a target gene and corresponds to the 3'-untranslated region of an HCV-RNA was fused with the open reading frame of the luciferase gene from the pGL3 expression vector. The pGL3 expression vector came from Promega Co., and is registered under Gene Accession No. U47296 with the National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA. Nucleotides 280 to 1932 were used as the luciferase gene. The 26-nucleotide-long sequence is a sequence that is present in many HCV genomes and their subtypes and that is highly preserved. The 26 nucleotides correspond to Nucleotides 9531 to 9556 of the HCV genome that is registered with the NCBI under Gene Accession No. D89815. They exhibit the following sequence:

5'-gtcacggct agctgtgaaa ggtccgt-3' (SEQ ID NO: 1).

The resulting fusion gene has been cloned as a BamHI/NotI DNA fragment in the eukaryotic expression plasmid pCDNA 3.1 (+) by Invitrogen GmbH, Karlsruhe Technology Park, Emmy Noether Str. 10, 76131 Karlsruhe, Catalogue No. V790-20. The resulting plasmid is designated p8.

The pCMVβGal plasmid from Clontech, Gene Accession No. U13186, NCBI, was used to control for transfection effectiveness. This

plasmid codes for the enzyme  $\beta$ -galactosidase and induces its expression.

The plasmid that contains the fusion gene, the plasmid that serves as the control, and various dsRNAs were introduced together by transfection into cells of the liver cell line HuH-7 (JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan). Inhibition of expression of the luciferase gene that was induced by the dsRNAs has been determined in relation to the expression of the  $\beta$ -galactosidase gene.

The dsRNAs that were used exhibit the following sequences designated as SEQ ID NO:2 to SEQ ID NO:13 in the sequence listing:

HCV1+2, whose S1 strand is completely complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

HCV3+4, which is complementary neither to the HCV- nor to the luciferase sequence in the fused HCV-luciferase gene, and which serves as negative control:

S2: 5'- AGA CAG UCG ACU UCA GCC U GG-3' (SEQ ID NO:12)

S1: 3'-GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A -5' (SEQ ID NO:13)

HCV5+6, whose S1 strand is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene, except for the nucleotide that is in bold:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA UGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU ACC AGG -5' (SEQ ID NO:7)

HCV7+8, whose S1 strand is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene, except for the two nucleotides that are in bold:

S2: 5'- ACG GCA AGC UGU GAA UGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:8)

S1: 3'-AG UGC CGU UCG ACA CUU ACC AGG -5' (SEQ ID NO:9)

Luc1+2, whose S1 strand is completely complementary to a luciferase sequence in the fused HCV-luciferase gene, and which serves as positive control:

S2: 5'- CGU UAU UUA UCG GAG UUG CAG UU-3' (SEQ ID NO: 10)

S1: 3'-GC GCA AUA AAU AGC CUC AAC GUC -5' (SEQ ID NO: 11)

K3s+K3as, which is complementary neither to the HCV- nor to the luciferase sequence in the fused HCV-luciferase gene, and which serves as negative control:

S2: 5'- G AUG AGG AUC GUU UCG CAU GA-3' (SEQ ID NO: 4)

S1: 3'-UCC UAC UCC UAG CAA AGC GUA -5' (SEQ ID NO: 5)

HCV5+2, whose S1 strand is completely complementary to the HCV sequence, and whose S2 strand is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene, except for the nucleotide that is in bold:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA UGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

HCV1+6, whose S2 strand is completely complementary to the HCV sequence, and whose S1 strand is complementary to the HCV sequence in the fused HCV-luciferase gene, except for the nucleotide that is in bold:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU ACC AGG -5' (SEQ ID NO:7)

HuH-7 cells were cultured in DMEM with 10% FCS. In preparation for transfection,  $2 \times 10^4$  cells per well of a 96-well cell culture plate were seeded. The cells were transfected 24 hours after seeding by means of 110  $\mu$ l transfection medium per well of the 96-well cell culture plate each, and cultured further in this total volume. Each transfection was done three times.

For that at first 3  $\mu$ g of the pCMV $\beta$ Gal plasmid and 1  $\mu$ g of the p8 plasmid were mixed. The transfection medium contained 0.25  $\mu$ g of the plasmid mixture, and 200, 100, 50, 25, 12.5, or 0 nmol/l of one of the aforementioned dsRNAs per well.

"Gene Porter 2" from PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl Thiersch Str. 2b, D-91052 Erlangen, Catalogue No. 13-T202007 was used for the transfection in accordance with manufacturer instructions.

Next, the cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. One day after transfection, 35  $\mu$ l of fresh medium was added per well, and the cells were incubated for another 24 hours.

The effect of the dsRNAs that were used was determined by quantifying expressed  $\beta$ -galactosidase by means of "Galacto-Star" from Tropix Corp., 47 Wiggins Avenue, Bedford, MA 01730, USA, Catalogue No. BM100S, and the effect of the expressed

luciferase was determined by chemoluminescence reaction by means of "Luciferase" from Tropix Corp., Catalogue No. BC100L. For that cell lysates were made in accordance with manufacturer instructions, and from that 2  $\mu$ l each was used per analysis to test for  $\beta$ -galactosidase and 5  $\mu$ l each was used per analysis to test for luciferase. Chemoluminescence measurement was done in a Sirius Luminometer (Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstr. 56-68, D-75173 Pforzheim, Germany). The relative activity of luciferase as a measurement of expression is determined in each case by dividing the luciferase value of chemoluminescence by the  $\beta$ -galactosidase value. An average is calculated for every 3 values determined in this way. The average for cells transfected without dsRNA is arbitrarily defined as 1.0. The other averages are expressed as a ratio with that value, and these are depicted graphically in Figures 1 and 2.

Luc1+2 (positive control) led to the most marked inhibition of luciferase activity (Figures 1 and 2). In the presence of HCV1+2, which was completely complementary to the target sequence for the reporter plasmid, a clear reduction in luciferase activity is also discernible (Figures 1 and 2). Luciferase activity increased with decreasing concentration of HCV1+2. The HCV5+6 oligonucleotide, which is not complementary to the target sequence by one nucleotide, is approximately as effective in inhibiting luciferase as HCV1+2, particularly at low concentrations (Figure 1). As far as the specificity of this dsRNA is concerned, this means that it is not enough for the dsRNA to be complementary to the target gene, while it is not complementary to the original gene by one nucleotide, to specifically inhibit expression of the target gene when compared to expression of the original gene.

HCV7+8 inhibits expression of luciferase both at high and at low concentrations only to the same degree as the negative controls HCV3+4 and K3S+K3AS (Figures 1 and 2). The scant inhibition of luciferase activity is to be seen as a nonspecific effect. As far as the specificity of this dsRNA is concerned, this means that it is enough for the dsRNA to be complementary to the target gene, or off by only one nucleotide, but not be complementary to the original gene by two nucleotides, to specifically inhibit expression of the target gene when compared to expression of the original gene.

In HCV5+2, one nucleotide in the S2 sense strand is not complementary to the S1 antisense strand, whereby the S1 antisense strand is completely complementary to the target gene. This dsRNA is as effective as LUC1+2 and HCV1+2 (figures 1 and 2). This is surprising because complementarity within dsRNA that is reduced by one base pair would lead one to expect a lesser stability of the dsRNA in the cell and therefore a lesser effectiveness.

In HCV6+1, one nucleotide in the S1 antisense strand is not complementary to the S2 sense strand, while the S1 antisense strand is also not complementary to the target gene by one nucleotide. HCV6+1 inhibits expression less effectively than HCV5+6, but more effectively than HCV7+8 (Figure 2). In other words, specificity and effectiveness of the expression-inhibiting action of dsRNA depends more on the sequence of the S1 antisense strand than on that of the S2 sense strand.

HCV3+4 (Figure 1) and K3S+K3AS (Figure 2), which serve as the negative controls, led to no and little inhibition of luciferase activity, respectively. The minute inhibition is

nonspecific, as it is not dependent on the dsRNA concentrations used.

The data show that at least two nucleotides in the antisense strand of a dsRNA that are not complementary to an original gene are necessary to prevent inhibition of expression of the original gene. Furthermore, the data show that it is possible to modulate the effectiveness of inhibition of the expression by a dsRNA by lessening the extent of complementarity of the single strands that form the dsRNA.

## Patent Claims

1. Use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene, whereby an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene.
2. Use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) to produce a medicament to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene, whereby an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene.
3. Use in accordance with Claim 1 or 2, whereby the nucleotide that is not complementary to the target gene is not located at the 3'- or 5'-end of the region.
4. Use in accordance with one of the previous claims, whereby the target gene exhibits one or two point mutations not seen in the original gene.
5. Use in accordance with one of the previous claims, whereby the original gene is a proto-oncogene and the target gene is an oncogene derived from it.



6. Use in accordance with one of the previous claims, whereby the cell is a tumor cell.
7. Use in accordance with one of the previous claims, whereby one nucleotide of the region is not complementary to the target gene, and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene.
8. Use in accordance with one of the previous claims, whereby at least one base pair within the dsRNA is not complementary.
9. Use in accordance with one of the previous claims, whereby the dsRNA exhibits a single-stranded overhang at least at one end of the dsRNA, consisting of 1 to 4, in particular of 2 or 3 nucleotides.
10. Use in accordance with Claim 9, whereby the dsRNA exhibits the overhang exclusively at one end, in particular at its end exhibiting the 3'-end of the S1 strand.
11. Use in accordance with one of the previous claims, whereby the S1 strand or an S2 strand possibly contained in the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
12. Use in accordance with one of the previous claims, whereby the dsRNA is present in a preparation suitable for inhalation, oral ingestion, infusion, or injection, in particular for intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection.

13. Use in accordance with Claim 12, whereby the preparation consists of the dsRNA and a physiologically tolerated buffer, particularly a phosphate buffered saline solution.
14. Use in accordance with one of the previous claims, whereby dsRNA is present in a physiologically tolerated buffer, particularly a phosphate buffered saline solution, or surrounded by a micellar structure, preferably a liposome, a virus capsid, or a capsoid.
15. Use in accordance with one of the previous claims, whereby dsRNA is administered orally, by inhalation, infusion, or injection, in particular by intravenous, intraperitoneal, or intratumoral infusion or injection.
16. Use in accordance with one of the previous claims, whereby dsRNA is administered to a mammal, preferably a human being, at a maximum dosage of 5 mg, particularly 2.5 mg, preferably 200  $\mu$ g, most preferably 100  $\mu$ g per kilogram body weight per day.
17. Medicament to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene, whereby the medicament contains a double-stranded ribonucleotic acid (dsRNA), whereby an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene.

18. Medicament in accordance with Claim 17, whereby the nucleotide that is not complementary to the target gene is not located at the 3'- or 5'-end of the region.
19. Medicament in accordance with Claim 17 or 18, whereby the target gene exhibits one or two point mutations not seen in the original gene.
20. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 19, whereby the original gene is a proto-oncogene and the target gene is an oncogene derived from it.
21. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 20, whereby the cell is a tumor cell.
22. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 21, whereby one nucleotide of the region is not complementary to the target gene, and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene.
23. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 22, whereby at least one base pair within the dsRNA is not complementary.
24. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 23, whereby the dsRNA exhibits a single-stranded overhang at least at one end of the dsRNA, consisting of 1 to 4, in particular of 2 or 3 nucleotides.
25. Medicament in accordance with Claim 24, whereby the dsRNA exhibits the overhang exclusively at one end, in particular at its end exhibiting the 3'-end of the S1 strand.

26. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 25, whereby the S1 strand or an S2 strand possibly contained in the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
27. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 26, whereby the medicament exhibits a preparation suitable for inhalation, oral ingestion, infusion or injection, in particular for intravenous, intraperitoneal or intratumoral infusion or injection.
28. Medicament in accordance with Claim 27, whereby the preparation consists of the dsRNA and a physiologically tolerated buffer, in particular a phosphate buffered saline solution.
29. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 28, whereby dsRNA is present in the medicament in a solution, particularly a physiologically tolerated buffer, or surrounded by a micellar structure, preferably a liposome, a virus capsid, or a capsid.
30. Medicament in accordance with one of the Claims 17 to 29, whereby in each intended dosage unit the dsRNA is present in a quantity that corresponds to a maximum dosage of 5 mg, particularly 2.5 mg, preferably 200  $\mu$ g, most preferably 100  $\mu$ g per kilogram body weight.
31. Method to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene, whereby a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) is introduced into the cell, and an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target

gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene.

32. Method in accordance with Claim 31, whereby the nucleotide that is not complementary to the target gene is not located at the 3'- or 5'-end of the region.
33. Method in accordance with Claim 31 or 32, whereby the target gene exhibits one or two point mutations not seen in the original gene.
34. Method in accordance with one of the Claims 31 to 33, whereby the original gene is a proto-oncogene and the target gene is an oncogene derived from it.
35. Method in accordance with one of the Claims 31 to 34, whereby the cell is a tumor cell.
36. Method in accordance with one of the Claims 31 to 35, whereby one nucleotide of the region is not complementary to the target gene, and two nucleotides of the region are not complementary to the original gene.
37. Method in accordance with one of the Claims 31 to 36, whereby at least one base pair within the dsRNA is not complementary.
38. Method in accordance with one of the Claims 31 to 37, whereby the dsRNA exhibits a single-stranded overhang at least at one end of the dsRNA, consisting of 1 to 4, in particular of 2 or 3 nucleotides.

39. Method in accordance with Claim 38, whereby the dsRNA exhibits the overhang exclusively at one end, in particular at its end exhibiting the 3'-end of the S1 strand.
40. Method in accordance with one of the Claims 31 to 39, whereby the S1 strand or an S2 strand possibly contained in the dsRNA is complementary to the primary or processed RNA transcript of the target gene.
41. Method in accordance with one of the Claims 31 to 40, whereby dsRNA is present in a solution, particularly a phosphate buffered saline solution, or surrounded by a micellar structure, preferably a liposome, a virus capsid, or a capsoid.

### Summary

The invention concerns the use of a double-stranded ribonucleic acid (dsRNA) to selectively inhibit expression of a given target gene in a cell with a point mutation not found in an original gene, whereby an S1 strand of the dsRNA exhibits a region that is complementary to the target gene, in which at least one nucleotide is not complementary to the target gene, and at least one nucleotide more than to the target gene is not complementary to the original gene.

## SEQUENCE LISTING

<110> Ribopharma AG

<120> Use of a double-stranded ribonucleic acid to selectively inhibit expression of a given target gene

<130> 422290EH

<140>

<141>

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 26

<212> DNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 1

gtcacggcta gctgtgaaag gtccgt

26

<210> 2

<211> 23

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 2

acggcuagcu gugaaagguc cgu

23

<210> 3

<211> 23

<212> RNA

<213> Hepatitis C virus

<400> 3

ggaccuuuca cagcuagccg uga

23

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial sequence

<220>

<223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA that is complementary to a sequence of the neomycin resistance gene

<400> 4

gaugaggau cguuucgcaug a

21

<210> 5

<211> 21

DE-102 35 620.3



<212> RNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Description of the artificial sequence: antisense strand of a dsRNA that is complementary to a sequence of the neomycin resistance gene

<400> 5  
 augcgaaacg auccucaucc u 21

<210> 6  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 6  
 acggcuagcu gugaaugguc cgu 23

<210> 7  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 7  
 ggaccauucc cagcuagccg uga 23

<210> 8  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 8  
 acggcaagcu gugaaugguc cgu 23

<210> 9  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 9  
 ggaccauucc cagcuugccg uga 23

<210> 10  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Description of the artificial sequence: sense strand of a dsRNA that is complementary to a sequence of the luciferase gene

<400> 10  
 cguuauuuau cggaguugca guu 23

<210> 11  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Artificial sequence

<220>  
 <223> Description of the artificial sequence: antisense strand of a dsRNA  
 that is complementary to a sequence of the luciferase gene

<400> 11  
 cugcaacucc gauaaauaac gcg 23

<210> 12  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 12  
 agacagucga cuncagccug g 21

<210> 13  
 <211> 21  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus

<400> 13  
 aggcuagaagu cgacugucug g 21

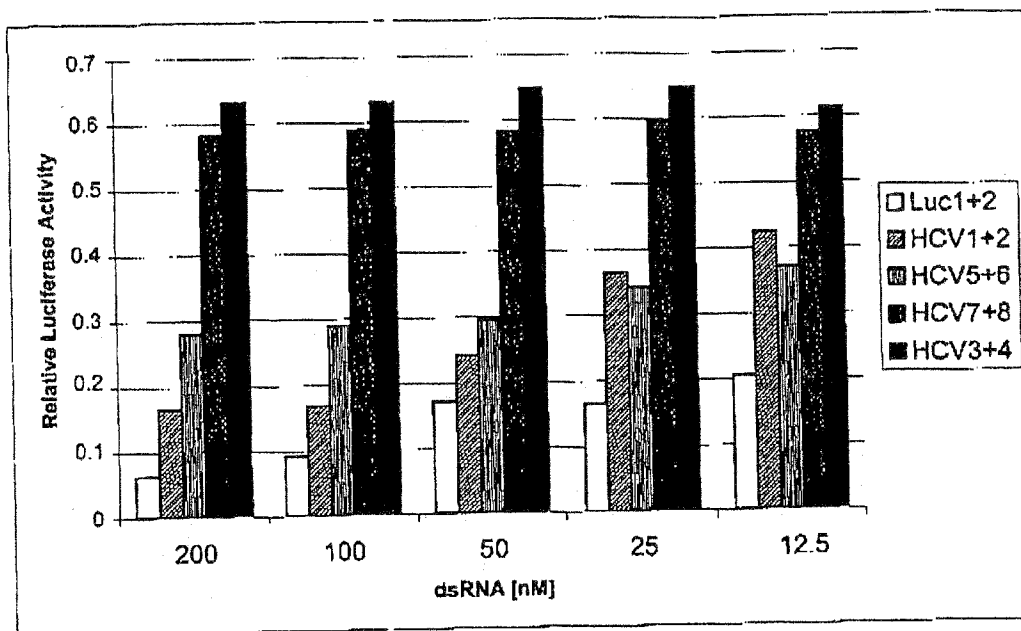


Fig. 1

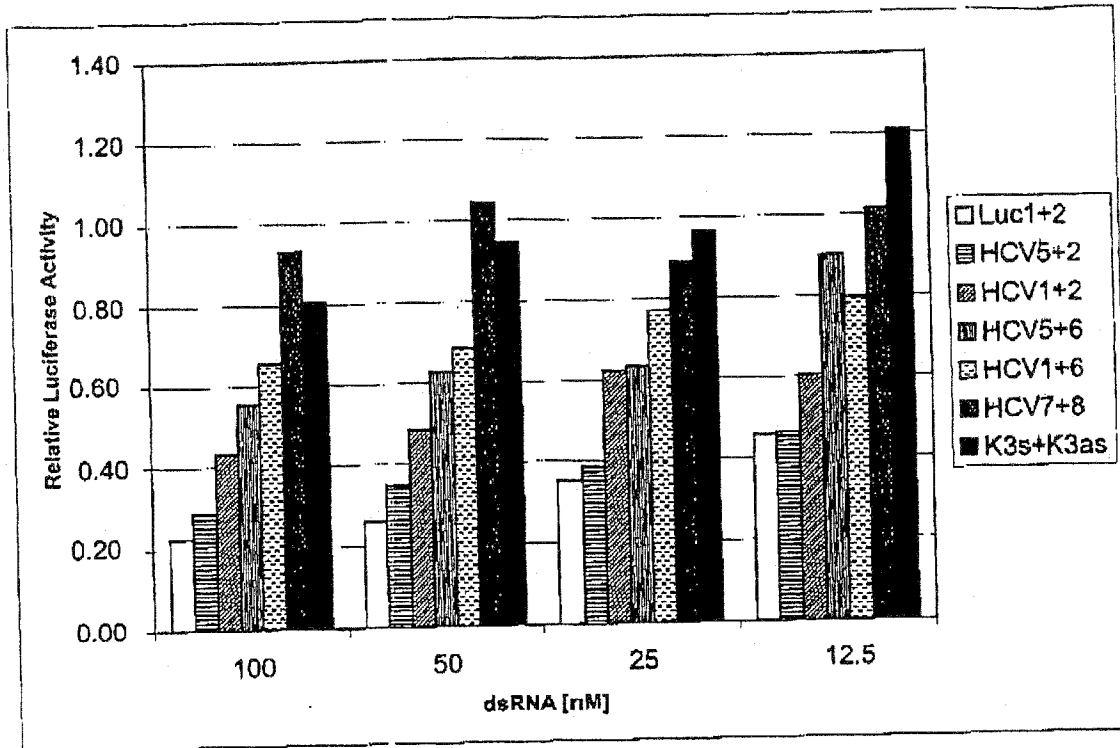


Fig. 2

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

REC'D 23 DEC 2002

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 102 35 620.3

**Anmeldetag:** 02. August 2002

**Anmelder/Inhaber:** Ribopharma AG,  
Kulmbach/DE

**Bezeichnung:** Verwendung einer doppelsträngigen  
Ribonukleinsäure zur gezielten Hemmung der  
Expression eines vorgegebenen Zielgens

**IPC:** A 61 K 31/7105

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 05. Dezember 2002  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Dzierzon

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

**Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens.**

5 Die Erfindung betrifft die Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle. Sie betrifft weiterhin die Verwendung einer solchen Ribonukleinsäure zur Herstellung eines  
10 Medikaments, ein Medikament und ein Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression des genannten Zielgens in einer Zelle.

Aus der DE 101 00 586 C1 ist ein Verfahren zur Hemmung der Expression eines Zielgens in einer Zelle bekannt, bei dem ein  
15 Oligoribonukleotid mit doppelsträngiger Struktur in die Zelle eingeführt wird. Ein Strang der doppelsträngigen Struktur ist dabei komplementär zum Zielgen.

Aus Elbashir, S. M. et al., Nature 411 (2001), Seiten 494 -  
20 498 ist es bekannt, dass eine kurze dsRNA, in welcher drei Nukleotide nicht komplementär zum Zielgen sind, die Expression eines Zielgens kaum noch hemmt. Eine vollständig komplementäre dsRNA bewirkt dagegen eine effektive Hemmung der Expression des Zielgens.

25 Aus Hoken, T. et al., Nucleic Acids Research 30 (2002), Seiten 1757 - 1766, ist es bekannt, dass eine Hemmung der Expression eines Gens durch kurze dsRNA im Wege der RNA-Interferenz auch mit dsRNAs möglich ist, deren einer Strang  
30 ein oder zwei zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotide aufweist.

Viele Krankheiten und Entartungen von Zellen beruhen darauf, dass ein für Zellen wichtiges Gen, häufig ein Proto-Onkogen, durch eine oder wenige Punktmutationen verändert ist. Das Problem bei der Behandlung einer solchen Krankheit oder solcher Zellen mit den bisher bekannten Methoden besteht darin, dass die Inhibition der Expression des mutierten Gens häufig ebenfalls zu einer Inhibition des nicht mutierten Gens führt. Dies hat oft gravierende Nebenwirkungen zur Folge.

10 Aufgabe der vorliegende Erfindung ist es, die Nachteile nach dem Stand der Technik zu vermeiden. Insbesondere soll eine Verwendung einer dsRNA zur gezielten Hemmung der Expression eines gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle bereitgestellt werden, bei der die Expression des  
15 Ursprungsgens weitgehend unbeeinflusst bleibt. Weiterhin soll ein Medikament und ein Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen Zielgens sowie eine Verwendung zur Herstellung des Medikaments bereitgestellt werden. Diese Aufgabe wird durch die Merkmale der Ansprüche 1, 2, 17 und 31  
20 gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen ergeben sich aus den Merkmalen der Ansprüche 3 bis 16, 18 bis 30 und 32 bis 41.

Erfindungsgemäß ist eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression  
25 eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen  
30 nicht komplementär zum Ursprungsgen ist. Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung einer solchen dsRNA zur Herstellung eines Medikaments zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punkt-

mutierten Zielgens in einer Zelle. Ein Nukleotid ist im Sinne dieser Erfindung "komplementär" zum Zielgen oder Ursprungsgen, wenn es mit einem ihm darin in seiner Sequenzposition entsprechenden Nukleotid eine spezifische Watson-Crick-

- 5 Basenpaarung ausbilden kann. Unter dem Zielgen wird im Allgemeinen der DNA-Strang der doppelsträngigen in der Zelle vorhandenen DNA verstanden, welcher komplementär zu einem bei der Transkription als Matrize dienenden DNA-Strang einschließ-  
 10 schließlich aller transkribierten Bereiche ist. Es handelt sich dabei also im Allgemeinen um den Sinn-Strang. Der Strang S1 kann somit komplementär zu einem bei der Expression gebildeten RNA-Transkript oder dessen Prozessierungsprodukt, wie z.B. einer mRNA, sein. Es kann z.B. ausreichend sein, wenn der Strang S1 komplementär zu einem Teil des 3'-untransla-  
 15 tierten Bereichs der mRNA ist. Bei dem Zielgen kann es sich aber auch um einen Teil eines viralen Genoms handeln. Das virale Genom kann auch das Genom eines (+)-Strang-RNA-Virus, insbesondere eines Hepatitis C-Virus, sein.

- 20 Das Ursprungsgen kann jedes beliebige Gen sein, welches von dem zu hemmenden Zielgen nur durch eine oder wenige Punktmutationen abweicht. Im Allgemeinen handelt es sich dabei um ein Wildtyp-Gen. Eine dsRNA liegt vor, wenn die aus einem oder zwei Nukleinsäure-Strängen bestehende Ribonukleinsäure  
 25 eine doppelsträngige Struktur aufweist. Nicht alle Nukleotide der dsRNA müssen innerhalb der dsRNA kanonische Watson-Crick-Basenpaarung aufweisen. Die maximal mögliche Zahl der Basenpaare ist die Zahl der Nukleotide in dem kürzesten in der dsRNA enthaltenden Strang. Der zum Zielgen komplementäre Bereich kann weniger als 25 aufeinander folgende Nukleotide,  
 30 insbesondere 19 bis 24, bevorzugt 21 bis 23, besonders bevorzugt 21 Nukleotide aufweisen. Der Strang S1 kann weniger als 30, vorzugsweise weniger als 25, besonders vorzugsweise 21



bis 24 Nukleotide aufweisen. Es hat sich gezeigt, dass kurze dsRNAs besonders effizient in der Hemmung der Expression eines Zielgens sind. Diese dsRNAs werden auch als siRNAs (short interfering RNAs) bezeichnet.

5

Bei der gezielten Hemmung wird die Expression des Ursprungsgens weniger inhibiert als diejenige des Zielgens. Im Idealfall bleibt die Expression des Ursprungsgens weitgehend unbeeinflusst. Dazu wird gezielt eine die Expression des Zielgens nicht optimal hemmende dsRNA verwendet. So kann eine dsRNA bereitgestellt werden, welche zum Ursprungsgen so wenig komplementär ist, dass dessen Expression weitgehend unbeeinflusst bleibt. Nebenwirkungen durch Hemmung des Ursprungsgens können vermieden oder verringert werden.

10

15

20

25

Die Hemmung der Expression durch die dsRNA erfolgt vorzugsweise nach dem Prinzip der RNA-Interferenz. Das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid ist bevorzugt nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen. Idealerweise liegt das nicht komplementäre Nukleotid im mittleren Teil des Bereichs. Das Zielgen kann gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweisen. Dann ist die erfindungsgemäße Verwendung zur gezielten Hemmung der Expression des Zielgens besonders geeignet, gezielt nur diese Expression, nicht aber diejenige des Ursprungsgens zu hemmen.

30

Bei einer Ausgestaltung der Erfindung ist das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen. Ein Onkogen unterscheidet sich häufig von dem ihm entsprechenden zellulären Proto-Onkogen nur durch eine einzige Punktmutation. Die Hemmung der Expression des Onkogens mit herkömmlicher dsRNA bewirkt daher üblicherweise auch eine Hemmung der Expression des entsprechenden Proto-Onkogens. Das

ist häufig mit so schwer wiegenden Nebenwirkungen verbunden, dass eine Verwendung herkömmlicher dsRNA zur Hemmung des Zielgens in einem Organismus kaum möglich ist.

- 5 Die Zelle kann dabei eine Tumorzelle sein. Bei einer Ausgestaltung der Erfindung ist ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen und zwei Nukleotide des Bereichs sind nicht komplementär zum Ursprungsgen. Bereits ein derart geringer Unterschied in der Zahl komplementärer Nukleotide  
 10 kann ausreichen, um die Expression des Zielgens nahezu vollständig zu hemmen und die Expression des Ursprungsgens weitgehend unbeeinflusst zu lassen.

- In einer Ausgestaltung des Verfahrens ist innerhalb der dsRNA  
 15 mindestens ein Basenpaar nicht komplementär, d.h. die Nukleotide des Basenpaars sind nicht spezifisch nach Watson-Crick gepaart. Durch die Variation der Zahl der nicht komplementären Basenpaare innerhalb der dsRNA kann die Wirksamkeit der dsRNA moduliert werden. Eine reduzierte Komplementarität innerhalb der dsRNA verringert deren Stabilität in der Zelle.  
 20

- Vorzugsweise weist die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang auf. Ein Ende ist dabei  
 25 ein Bereich der dsRNA, in welchem ein 5'- und ein 3'-Strangende vorliegen. Eine nur aus dem Strang S1 bestehende dsRNA weist demnach eine Schleifenstruktur und nur ein Ende auf. Eine aus dem Strang S1 und einem Strang S2 gebildete dsRNA weist zwei Enden auf. Ein Ende wird dann jeweils von  
 30 einem auf dem Strang S1 und einem auf dem Strang S2 liegenden Strangende gebildet. Einzelsträngige Überhänge verringern die Stabilität der dsRNA in Blut, Serum und Zellen und verstärken gleichzeitig die expressionshemmende Wirkung der dsRNA. Be-

sonders vorteilhaft ist es, wenn die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist. Das andere Ende ist dann bei einer zwei Enden aufweisenden dsRNA glatt, d.h. ohne Überhänge, ausgebildet. Überraschenderweise hat es sich gezeigt, dass zur Verstärkung der expressionshemmenden Wirkung der dsRNA ein Überhang an einem Ende der dsRNA ausreichend ist, ohne dabei die Stabilität in einem solchen Maße zu erniedrigen wie durch zwei Überhänge. Eine dsRNA mit nur einem Überhang hat sich sowohl in verschiedenen Zellkulturmedien als auch in Blut, Serum und Zellen als hinreichend beständig und besonders Wirksam erwiesen. Die Hemmung der Expression ist besonders effektiv, wenn sich der Überhang am 3'-Ende des Strangs S1 befindet.

15

Der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA enthaltener Strang S2 kann zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär sein. Die dsRNA kann in einer Zubereitung vorliegen, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion und Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist. Die Zubereitung kann dabei aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA bestehen. Es hat sich nämlich überraschenderweise herausgestellt, dass eine lediglich in einem solchen Puffer gelöste und verabreichte dsRNA von der Zelle aufgenommen wird und die Expression des Zielgens hemmt, ohne dass die dsRNA dazu in einem besonderen Vehikel verpackt sein muss.

30

Vorzugsweise liegt die dsRNA in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem

Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsid umschlossen vor. Die dsRNA kann oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht werden.

- 5 Vorzugsweise wird die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg pro kg Körpergewicht und Tag, einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht.

10

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Medikament zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure(dsRNA), wobei ein

15 Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.

20

Erfindungsgemäß ist weiterhin ein Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle vorgesehen, wobei eine doppelsträngige Ribonukleinsäure(dsRNA) in

25 die Zelle eingeführt wird und ein Strang S1 der dsRNA einem zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.

30

Wegen der weiteren vorteilhaften Ausgestaltungen des erfindungsgemäßen Medikaments und des erfindungsgemäßen Verfahrens wird auf die vorangegangenen Ausführungen verwiesen.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand der Zeichnungen beispielhaft erläutert. Es zeigen:

5 Fig. 1 eine grafische Darstellung der Hemmung der Expression eines HCV-Luziferase-Fusionsproteins durch dsRNAs, welche in unterschiedlichem Maße komplementär zu einer Sequenz eines Zielgens sind und

10 Fig. 2 eine grafische Darstellung der Hemmung der Expression eines HCV-Luziferase-Fusionsproteins durch dsRNAs, welche in unterschiedlichem Maße komplementär zu einer Sequenz eines Zielgens sind und teilweise aus nicht vollständig zueinander komplementären RNA-Strängen gebildet sind.

15

Zu Herstellung eines Reportersystems wurde eine 26 Nukleotide lange Sequenz einer als Zielgen dienenden, dem 3'-nicht-translatierten Bereich einer HCV-RNA entsprechenden cDNA-Sequenz mit dem offenen Leserahmen des Luziferase-Gens aus dem Expressionsvektor pGL3 fusioniert. Der Expressionsvektor pGL3 stammt von der Firma Promega und ist unter der Gene Accession Number U47296 beim National Center for Biotechnology Information (NCBI), National Library of Medicine, Building 38A, Bethesda, MD 20894, USA, registriert worden. Als Luziferase-Gen sind die Nukleotide 280 bis 1932 verwendet worden. Die 26 Nukleotide lange Sequenz ist eine in sehr vielen HCV-Genomen und deren Subtypen vorkommende hoch konservierte Sequenz. Bei dem unter der Gene Accession Number D89815 beim NCBI registrierten HCV-Genom entsprechen die 26 Nukleotide den Nukleotiden 9531 bis 9556. Sie weisen die folgende Sequenz auf:

5'-gtcacggct agctgtgaaa ggtccgt-3' (SEQ ID NO: 1).

Das resultierende Fusions-Gen ist als BamHI/NotI-DNA-Fragment in das eukaryotische Expressionsplasmid pcDNA 3.1 (+) von der Firma Invitrogen GmbH, Technologiepark Karlsruhe, Emmy-Noether Strasse 10, D-76131 Karlsruhe, Katalog Nr. V790-20, kloniert worden. Das resultierende Plasmid wird als p8 bezeichnet.

Als Kontrolle für die Transfektionseffizienz ist das Plasmid pCMV $\beta$ Gal der Firma Clontech, Gene Accession Number U13186, NCBI, verwendet worden. Dieses Plasmid kodiert für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase und bewirkt dessen Expression.

Das das Fusions-Gen enthaltende Plasmid, das zur Kontrolle dienende Plasmid und unterschiedliche dsRNAs sind gemeinsam durch Transfektion in Zellen der Leberzelllinie HuH-7 (JCRB0403, Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, National Institute of Health Sciences, Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158, Japan) eingeführt worden. Die durch die dsRNAs herbeigeführte Hemmung der Expression des Luziferase-Gens ist im Verhältnis zur Expression des  $\beta$ -Galaktosidase-Gens bestimmt worden.

Die eingesetzten dsRNAs weisen folgende, im Sequenzprotokoll mit SEQ ID NO:2 bis SEQ ID NO:13 bezeichneten Sequenzen auf:

HCV1+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)  
S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

HCV3+4, welche weder zu der HCV- noch zu der Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen komplementär ist und als Negativkontrolle dient:

- 5 S2: 5'- AGA CAG UCG ACU UCA GCC U GG-3' (SEQ ID NO:12)  
S1: 3'-GG UCU GUC AGC UGA AGU CGG A -5' (SEQ ID NO:13)

10 HCV5+6, deren Strang S1 abgesehen von dem durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

- S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)  
S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU **ACC** AGG -5' (SEQ ID NO:7)

15 HCV7+8, deren Strang S1 abgesehen von den zwei durch Fettdruck hervorgehobenen Nukleotiden komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

- S2: 5'- ACG GCA AGC UGU GAA **UGG** UCC GU-3' (SEQ ID NO:8)  
20 S1: 3'-AG UGC CGU UCG ACA CUU **ACC** AGG -5' (SEQ ID NO:9)

Luc1+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu einer Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist und als Positivkontrolle dient:

- 25 S2: 5'- CGU UAU UUA UCG GAG UUG CAG UU-3' (SEQ ID NO: 10)  
S1: 3'-GC GCA AUA AAU AGC CUC AAC GUC -5' (SEQ ID NO: 11)

30 K3s+K3as, welche weder zu der HCV- noch zu einer Luziferase-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen komplementär ist und als Negativkontrolle dient:

S2: 5'- G AUG AGG AUC GUU UCG CAU GA-3' (SEQ ID NO: 4)

S1: 3'-UCC UAC UCC UAG CAA AGC GUA -5' (SEQ ID NO: 5)

5 HCV5+2, deren Strang S1 vollständig komplementär zu der HCV-Sequenz ist und deren Strang S2 abgesehen von dem durch Fett-druck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

10 S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA UGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:6)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU UCC AGG -5' (SEQ ID NO:3)

HCV1+6, deren Strang S2 vollständig komplementär zu der HCV-Sequenz ist und deren Strang S1 abgesehen von dem durch Fett-druck hervorgehobenen Nukleotid komplementär zu der HCV-Sequenz in dem fusionierten HCV-Luziferase-Gen ist:

S2: 5'- ACG GCU AGC UGU GAA AGG UCC GU-3' (SEQ ID NO:2)

S1: 3'-AG UGC CGA UCG ACA CUU ACC AGG -5' (SEQ ID NO:7)

20

HuH-7-Zellen sind in DMEM mit 10 % FCS kultiviert worden. Zur Vorbereitung einer Transfektion wurden 2 x 10E4 Zellen pro Vertiefung einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Die Zellen sind 24 Stunden nach der Aussaat mittels je 110 µl Transfektionsmedium pro Vertiefung der 96-Well-Zellkulturplatte transfiziert und in diesem Gesamtvolumen weiter kultiviert worden. Jede Transfektion ist dreifach durchgeführt worden.

30 Dazu sind zunächst 3 µg des Plasmids pCMVβGal mit 1 µg des Plasmids p8 gemischt worden. Das Transfektionsmedium enthielt je Vertiefung 0,25 µg des Gemischs der Plasmide und 200, 100, 50, 25, 12,5 oder 0 nmol/l einer der genannten dsRNAs.



Zur Transfektion wurde "Gene Porter 2" der Firma PEQLAB Biotechnologie GmbH, Carl-Thiersch-Str. 2 b, D-91052 Erlangen, Katalog Nummer 13-T202007 gemäß Herstellervorschrift eingesetzt.

5

Anschließend sind die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert worden. Einen Tag nach der Transfektion sind pro Vertiefung 35 µl frisches Medium zugegeben und die Zellen für weitere 24 h inkubiert worden.

10

Der Effekt der eingesetzten dsRNAs wurde durch Quantifizierung der exprimierten  $\beta$ -Galactosidase mittels "Galacto-Star" der Firma Tropix, 47 Wiggins Avenue, Bedford, MA 01730, USA Katalog-Nummer BM100S, und der Effekt der exprimierten Luzi-

15

ferase mittels "Luciferase" der Firma Tropix, Katalog-Nummer BC100L, durch Chemolumineszenz-Reaktion ermittelt. Dazu wurden Lysate der Zellen gemäß den Herstellervorschriften hergestellt und davon für den Nachweis der  $\beta$ -Galactosidase je 2 µl pro Analyse und für den Nachweis der Luziferase je 5 µl

20

pro Analyse eingesetzt. Die Messung der Chemolumineszenz erfolgte in einem Sirius-Luminometer der Firma Berthold Detection Systems GmbH, Bleichstrasse 56-68, D-75173 Pforzheim,

25

Deutschland. Die relative Aktivität der Luziferase als Maß für die Expression wird ermittelt, indem jeweils der für Luzi-

30

ferase ermittelte Wert der Chemolumineszenz durch den für  $\beta$ -Galactosidase ermittelten Wert dividiert wird. Für jeweils 3 so ermittelte Werte wird ein Mittelwert berechnet. Der Mittelwert für ohne dsRNA transfizierte Zellen wird willkürlich als 1,0 definiert. Die anderen Mittelwerte sind dazu ins Verhältnis gesetzt und in den Figuren 1 und 2 grafisch dargestellt.

Luc1+2 (Positivkontrolle) führte zur stärksten Hemmung der Luziferaseaktivität (Fig. 1 und 2). In Gegenwart von HCV1+2, welches vollständig komplementär zur Zielsequenz für das Reporterplasmid war, ist ebenfalls eine deutliche Reduktion der Luziferaseaktivität erkennbar (Fig. 1 und 2). Mit abnehmender Konzentration von HCV1+2 stieg die Luziferaseaktivität an. Das in einem Nukleotid nicht zur Zielsequenz komplementäre Oligonukleotid HCV5+6 ist ähnlich effizient in der Luziferasehemmung wie HCV1+2, insbesondere bei niedrigen Konzentrationen (Fig. 1). Für die Spezifität dieser dsRNA bedeutet das, dass es nicht ausreicht, wenn die dsRNA zum Zielgen komplementär, aber zum Ursprungsgen mit einem Nukleotid nicht komplementär ist, um die Expression des Zielgens spezifisch gegenüber der Expression des Ursprungsgens zu hemmen.

15

HCV7+8 hemmt die Expression der Luziferase sowohl bei hohen als auch bei niedrigen Konzentrationen nur im Maße der Negativkontrollen HCV3+4 und K3S+K3AS (Fig. 1 und 2). Die geringe Hemmung der Luziferaseaktivität ist als unspezifischer Effekt zu erachten. Für die Spezifität dieser dsRNA bedeutet das, dass es ausreicht, wenn die dsRNA zu dem Zielgen komplementär oder nur mit einem Nukleotid nicht komplementär, aber zum Ursprungsgen in zwei Nukleotiden nicht komplementär ist, um die Expression des Zielgens spezifisch gegenüber der Expression des Ursprungsgens zu hemmen.

25

In HCV5+2 ist ein Nukleotid im Sinn-Strang S2 nicht komplementär zum Antisinn-Strang S1, wobei der Antisinn-Strang S1 vollständig komplementär zum Zielgen ist. Diese dsRNA ist so effizient wie LUC1+2 und HCV1+2 (Fig. 1 + 2). Das ist überraschend, da eine um ein Basenpaar reduzierte Komplementarität innerhalb der dsRNA eine geringere Stabilität der dsRNA in der Zelle und deshalb eine geringere Effizienz erwarten ließ.

30

In HCV6+1 ist ein Nukleotid im Antisinn-Strang S1 nicht komplementär zum Sinn-Strang S2, wobei der Antisinn-Strang S1 auch mit einem Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen ist.  
5 HCV6+1 hemmt die Expression weniger effizient als HCV5+6, aber effizienter als HCV7+8 (Fig. 2). Für die Spezifität und Effizienz der expressionshemmenden Wirkung der dsRNA kommt es somit mehr auf die Sequenz des Antisinn-Strangs S1 als diejenige des Sinn-Strangs S2 an.

10

Die als Negativkontrolle dienenden HCV3+4 (Fig. 1) und K3S+K3AS (Fig. 2) führten zu keiner bzw. einer geringen Hemmung der Luziferase-Aktivität. Die geringe Hemmung ist unspezifisch, da sie nicht von der eingesetzten Konzentration der dsRNAs abhängt.  
15

Die Daten zeigen, dass mindestens zwei nicht zu einem Ursprungsgen komplementäre Nukleotide im Antisinn-Strang einer dsRNA notwendig sind, um eine Inhibition der Expression des Ursprungsgens zu verhindern. Weiterhin zeigen die Daten, dass  
20 eine Modulation der Wirksamkeit der Hemmung der Expression durch eine dsRNA möglich ist, indem das Maß der Komplementarität der die dsRNA bildenden Einzelstränge verringert wird.

## Patentansprüche

1. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.
2. Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur Herstellung eines Medikaments zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.
3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.
4. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.
5. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.
6. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.

7. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.
- 5 8. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist.
9. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
10. Verwendung nach Anspruch 9, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
- 15 11. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA enthaltener Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
12. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Zubereitung vorliegt, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
- 25 13. Verwendung nach Anspruch 12, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.
- 30 14. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder

von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.

- 5 15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA oral, mittels Inhalation, Infusion oder Injektion, insbesondere intravenöser, intraperitonealer oder intratumoraler Infusion oder Injektion, verabreicht wird.
16. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die dsRNA in einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, pro kg Körpergewicht pro Tag, einem Säugetier, vorzugsweise einem Menschen, verabreicht wird.
- 15 17. Medikament zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, enthaltend eine doppelsträngige Ribonukleinsäure(dsRNA), wobei ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.
- 20 18. Medikament nach Anspruch 17, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.
- 25 19. Medikament nach Anspruch 17 oder 18, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.
- 30 20. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.

21. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 20, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.
22. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 21, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.
23. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 22, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist
24. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 23, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
25. Medikament nach Anspruch 24, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
26. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 25, wobei der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA enthaltener Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
27. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 26, wobei das Medikament eine Zubereitung aufweist, die zur Inhalation, oralen Aufnahme, Infusion oder Injektion, insbesondere zur intravenösen, intraperitonealen oder intratumoralen Infusion oder Injektion, geeignet ist.
28. Medikament nach Anspruch 27, wobei die Zubereitung aus einem physiologisch verträglichen Puffer, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, und der dsRNA besteht.

29. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 28, wobei die dsRNA in dem Medikament in einer Lösung, insbesondere einem physiologisch verträglichen Puffer, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.
30. Medikament nach einem der Ansprüche 17 bis 29, wobei die dsRNA pro vorgesehener Verabreichungseinheit in einer Menge enthalten ist, welche einer Dosierung von höchstens 5 mg, insbesondere höchstens 2,5 mg, bevorzugt höchstens 200 µg, besonders bevorzugt höchstens 100 µg, pro kg Körpergewicht entspricht.
31. Verfahren zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei eine doppelsträngige Ribonukleinsäure(dsRNA) in die Zelle eingeführt wird und ein Strang S1 der dsRNA einen zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.
32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei das zum Zielgen nicht komplementäre Nukleotid nicht am 3'- oder am 5'-Ende des Bereichs gelegen ist.
33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32, wobei das Zielgen gegenüber dem Ursprungsgen eine oder zwei Punktmutationen aufweist.
34. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 33, wobei das Ursprungsgen ein Proto-Onkogen und das Zielgen ein davon abgeleitetes Onkogen ist.



35. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 34, wobei die Zelle eine Tumorzelle ist.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35, wobei ein Nukleotid des Bereichs nicht komplementär zum Zielgen ist und zwei Nukleotide des Bereichs nicht komplementär zum Ursprungsgen sind.
37. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 36, wobei innerhalb der dsRNA mindestens ein Basenpaar nicht komplementär ist.
38. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 37, wobei die dsRNA zumindest an einem Ende der dsRNA einen aus 1 bis 4, insbesondere 2 oder 3, Nukleotiden gebildeten einzelsträngigen Überhang aufweist.
39. Verfahren nach Anspruch 38, wobei die dsRNA den Überhang ausschließlich an einem, insbesondere ihrem das 3'-Ende des Strangs S1 aufweisenden, Ende aufweist.
40. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 39, wobei der Strang S1 oder ein gegebenenfalls in der dsRNA enthaltener Strang S2 zum primären oder prozessierten RNA-Transkript des Zielgens komplementär ist.
41. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 40, wobei die dsRNA in einer Lösung, insbesondere einer phosphatgepufferten Salzlösung, oder von einer micellaren Struktur, vorzugsweise einem Liposom, einem Virus-Kapsid oder einem Kapsoid umschlossen vorliegt.

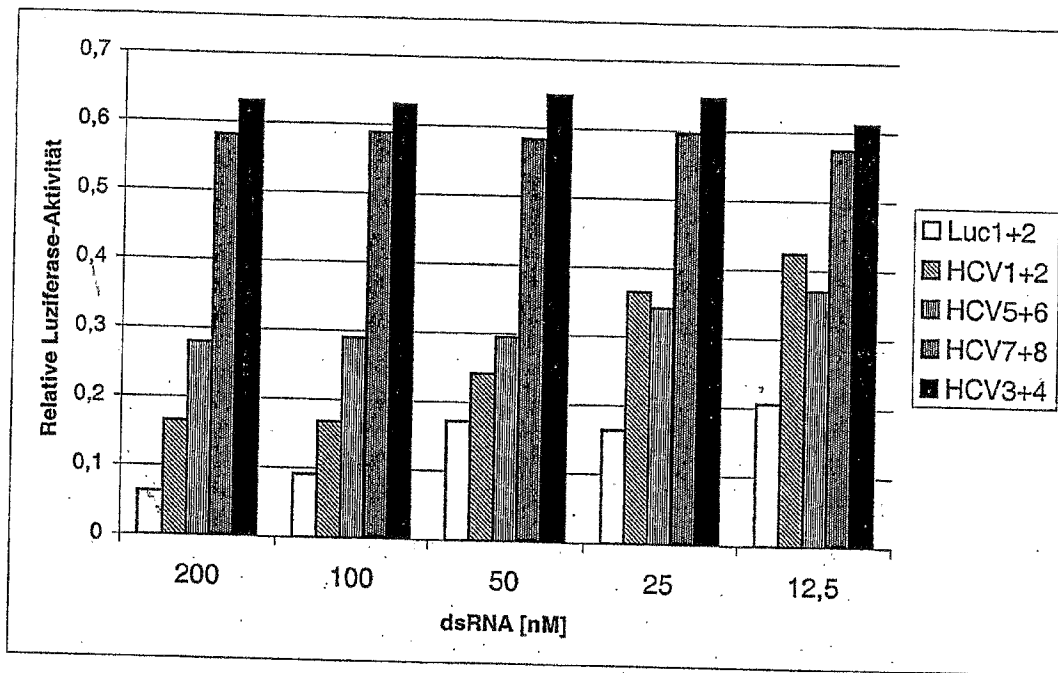


Fig. 1

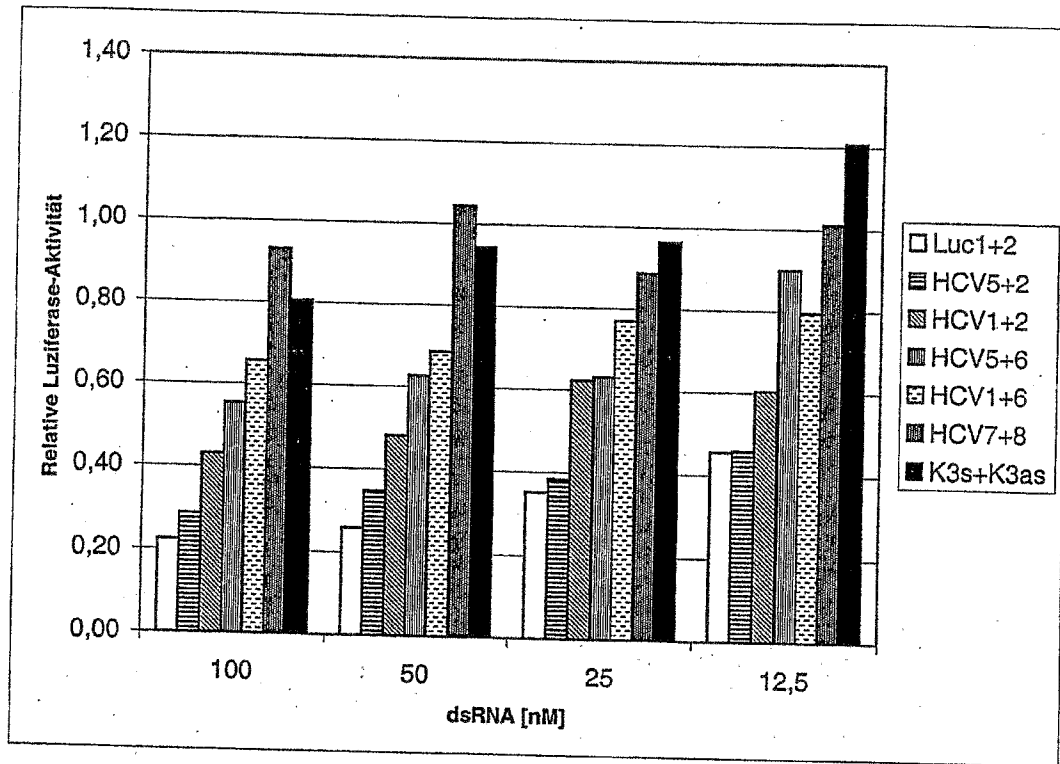


Fig. 2

## Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft eine Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure (dsRNA) zur gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen, gegenüber einem Ursprungsgen punktmutierten Zielgens in einer Zelle, wobei ein Strang S1 der dsRNA einem zum Zielgen komplementären Bereich aufweist, in welchem mindestens ein Nukleotid nicht komplementär zum Zielgen und mindestens ein Nukleotid mehr als zum Zielgen nicht komplementär zum Ursprungsgen ist.

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Ribopharma AG

5 <120> Verwendung einer doppelsträngigen Ribonukleinsäure zur  
gezielten Hemmung der Expression eines vorgegebenen  
Zielgens

10 <130> 422290EH

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

15 <160> 13

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 1

25 gtcacggcta gctgtgaaag gtcctg

26

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

30 <213> Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 2

acggcuagcu gugaaagguc cgu

23

35

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Hepatitis C virus

&lt;400&gt; 3

ggaccuuuca cagcuagccg uga

23

45

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

&lt;213&gt; Künstliche Sequenz

50

&lt;220&gt;

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang  
einer zu einer Sequenz des Neomycin-Resistenzgens  
komplementären dsRNA

55

&lt;400&gt; 4

gaugaggau c guuucgcaug a

21

60

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 21

&lt;212&gt; RNA

<213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 5 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:  
 Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des  
 Neomycin-Resistenzgens komplementären dsRNA  
 <400> 5  
 10 augcgaaacg auccucaucc u 21  
 <210> 6  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 15 <213> Hepatitis C virus  
 <400> 6  
 acggcuagcu gugaugguc cgu 23  
 <210> 7  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 25 <213> Hepatitis C virus  
 <400> 7  
 ggaccauuca cagcuagccg uga 23  
 30 <210> 8  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus  
 35 <400> 8  
 acggcaagcu gugaugguc cgu 23  
 <210> 9  
 <211> 23  
 <212> RNA  
 <213> Hepatitis C virus  
 45 <400> 9  
 ggaccauuca cagcuugccg uga 23  
 <210> 10  
 <211> 23  
 50 <212> RNA  
 <213> Künstliche Sequenz  
 <220>  
 55 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: Sinn-Strang  
 einer zu einer Sequenz des Luziferasegens  
 komplementären dsRNA  
 <400> 10  
 60 cguuauuuau cggaguugca guu 23

```
<210> 11
<211> 23
<212> RNA
<213> Künstliche Sequenz
```

5

```
<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:
        Antisinn-Strang einer zu einer Sequenz des
        Luziferasegens komplementären dsRNA
```

10

<400> 11  
cugcaacucc gauaaauaac gcg

23

15      <210> 12  
         <211> 21  
         <212> RNA  
         <213> Hepatitis C virus

<400> 12  
agacagucga cuucagccug g

21

25      <210> 13  
         <211> 21  
         <212> RNA  
         <213> Hepatitis C virus

<400> 13  
aggcugaagu cgacugucug g

21

35